

龙航宇, 陶佳梦, 姜亚杰, 等. 噬菌体裂解酶 Cp51 在重组乳酸菌中的表达及对 A 型产气荚膜梭菌的抗菌活性 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(1): 42-47.
LONG Hangyu, TAO Jiameng, JIANG Yajie, et al. Expression of phage lysin Cp51 in recombinant *Lactococcus lactis* and its antibacterial activity against *Clostridium perfringens* type A[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(1): 42-47.

噬菌体裂解酶 Cp51 在重组乳酸菌中的表达及 对 A 型产气荚膜梭菌的抗菌活性

龙航宇, 陶佳梦, 姜亚杰, 李晓斌, 邹佳汝, 翁亚彪, 林瑞庆
(华南农业大学 兽医学院/广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】构建 A 型产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens* 裂解酶重组表达乳酸菌 *Lactococcus lactis*, 并检测重组菌及其表达产物的抗菌效果。【方法】全基因合成噬菌体裂解酶 *Cp51* 基因, 构建 PNZ8148-Cp51 原核表达重组载体, 电转化至乳酸菌 NZ9000, 经乳糖菌肽诱导表达可溶性 Cp51 蛋白; 用比浊法检测表达蛋白对 A 型产气荚膜梭菌的抗菌活性; 利用细菌液混合培养检测重组菌对 A 型产气荚膜梭菌增殖的抑制作用。【结果】噬菌体裂解酶 Cp51 在乳酸菌中成功表达, 为 1 268 bp; 质量浓度 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上的重组蛋白对 A 型产气荚膜梭菌具有高效抗菌活性; 重组乳酸菌对 A 型产气荚膜梭菌增殖有一定的抑制效果, 混合培养后使产气荚膜梭菌活菌数从 $9\times 10^9\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 下降到约 $9\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。【结论】A 型产气荚膜梭菌噬菌体裂解酶重组乳酸菌构建成功, 为后续优化表达和临床应用研究奠定了基础。

关键词: 产气荚膜梭菌; 乳酸菌; 裂解酶; 重组蛋白; 抗菌活性
中图分类号: Q939.48; S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)01-0042-06

Expression of phage lysin Cp51 in recombinant *Lactococcus lactis* and its antibacterial activity against *Clostridium perfringens* type A

LONG Hangyu, TAO Jiameng, JIANG Yajie, LI Xiaobin, ZOU Jiaru, WENG Yabiao, LIN Ruiqing
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To construct a recombinant *Lactococcus lactis* expression system of phage lysine Cp51, and study its antibacterial activity against *Clostridium perfringens* type A *in vitro*. 【Method】Phage lysin Cp51 gene was inserted into the prokaryotic expression vector PNZ8148, and then the recombinant vector PNZ8148-Cp51 was constructed and transformed into *L. lactis* NZ9000. Nisin was used to induce expression of soluble protein Cp51. The antibacterial activity of the recombinant protein against *C. perfringens* type A was detected by kinetic turbidimetric assay *in vitro*. The inhibitory effect of recombinant *L. lactis* on the proliferation of *C. perfringens* type A was tested by mixed cultivation. 【Result】The recombinant phage lysin Cp51 was successfully expressed in *L. lactis* and the Cp51 gene was 1 268 bp in length. The recombinant protein had strong antibacterial activity against *C. perfringens* type A at the concentration above 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *in vitro*. The recombinant *L. lactis* also had certain inhibitory effect on *C. perfringens* type A with the number of *C. perfringens* decreased from $9\times 10^9\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ to $9\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ after mixed cultivation. 【Conclusion】Recombinant *L. lactis*

expressing phage lysin Cp51 which against *C. perfringens* type A has been successfully constructed, which provides a basis for further optimization of expression and clinical application.

Key words: *Clostridium perfringens*; *Lactococcus lactis*; lysin; recombinant protein; antibacterial activity

产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens* 又称魏氏梭菌, 是一种革兰阳性的人兽共患病病原菌, 按其所产生的 4 种毒素 (α 、 β 、 ϵ 和 ι) 分为 A、B、C、D 和 E 型^[1], 最近有研究根据其分泌的肠毒素 (*C. perfringens* enterotoxin, CPE) 和 NetB 毒素可再分出 F 和 G 型^[2]。普遍认为 A 型产气荚膜梭菌主要引起家禽坏死性肠炎^[3-4], 传统上对于该病的防治措施为使用抗生素。随着人们生活水平的提高, 人们对食品安全也越发重视, 无抗养殖已为大势所趋, 在此背景下, 产气荚膜梭菌病发病率有所提高, 给养殖业带来巨大损失。

噬菌体裂解酶作为一种专一的杀菌物质, 有望替代抗生素, 控制细菌性疾病的发生。裂解酶是噬菌体于侵染细菌后期合成、作用于细菌细胞壁肽聚糖层的一种酶, 其作用为破坏宿主细胞壁, 释放子代噬菌体^[5]。裂解酶可从外部直接作用于革兰阳性细菌的细胞壁, 较噬菌体省去了侵染、复制等过程, 更为高效。乳酸菌是一类能够利用碳水化合物产生乳酸的革兰阳性细菌的统称, 自然界中已发现的乳酸菌可划分为 23 个属^[6-7], 主要包括乳杆菌、乳球菌、明串珠菌、片球菌、链球菌及双歧杆菌等。其中, 乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 作为乳酸菌的模式菌, 其完整基因组测序已经完成, 对调控基因和操纵子方面的研究日趋完善, 为乳酸菌基因工程改造和表达载体的构建奠定了基础。乳酸菌的乳链菌肽 (Nisin) 诱导表达系统 (Nisin-controlled expression system, NICE) 极具发展前景, 不仅调控严格, 诱导物 Nisin 无毒害无残留且容易获得, 作为饲用诱导物优势明显^[8]。乳酸菌是人和动物肠道内正常菌群之一, 能促进营养物质的合成、改善胃肠道功能、缓解糖尿病、增强免疫力, 为公认的食品级微生物^[9-10]。除了本身的益生作用, 乳酸菌没有内毒素, 表达的外源蛋白质不需要经过纯化可以直接连同菌体一起服用, 而且乳酸菌可以在肠道中定植存活^[11], 口服基因工程重组乳酸菌后, 其表达的用于治疗或免疫作用的蛋白就可以源源不断在肠道中产生并起到相应的作用。

本试验以乳酸乳球菌 NZ9000 表达 A 型产气荚膜梭菌噬菌体裂解酶 Cp51^[12], 并检测表达产物和重组菌的体外杀菌效果, 为产气荚膜梭菌病的新型药物和临床应用研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 A 型产气荚膜梭菌 Cp2-4 来自华南农业大学寄生虫实验室, 大肠埃希菌 *Escherichia coli* MC1061 购自北京华越洋生物科技有限公司; 乳酸乳球菌 NZ9000、质粒 NZ8148 购自德国 Mobitec 公司。

1.1.2 培养基、试剂和仪器 M17 培养基 (海博生物技术有限公司); GM17C 培养基 (M17 培养基中加入终质量浓度为 $0.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖、 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的氯霉素); GM17MC 恢复培养基 (含 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 的 GM17 培养基)。

QuickCut *Nco*I 内切酶、QuickCut *Hind*III 内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker DL5000、凝胶回收试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo 公司); 质粒抽提试剂盒 (广州东盛生物科技有限公司); 氯霉素 (SIGMA 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、抗 His 鼠单克隆抗体、HRP 羊抗鼠 IgG (北京全式金公司); 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); Nisin、TSC 琼脂、咪唑 (广州鼎国生物); 镍填料 Ni Sepharose™6 Fast Flow (美国 GE 公司); 2 mm 电击杯 (美国 BTX 公司)。其他试剂为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目的基因与载体构建 A 型产气荚膜梭菌噬菌体裂解酶 Cp51 DNA 序列从 GeneBank (AGH27916.1) 中查找, 序列 5' 端前加入 *Nco*I 酶切位点、Usp45 的信号肽碱基序列, 3' 端终止密码子前加入 6×His 标签, 终止密码子后加入 *Hind*III 酶切位点。因引入了酶切位点 *Nco*I, 为不引起移码突变, 在信号肽前补 2 个 A 碱基, 构成 1 268 bp 的 DNA 序列, 序列发送至北京六合华大基因科技有限公司, 进行乳酸菌表达密码子偏好性优化后, 合成全基因。合成基因重组于 PUC57 克隆载体上。提取 PUC57-Cp51 质粒以及乳酸菌表达载体 PNZ8148 经内切酶 *Nco*I、*Hind*III 双酶切, 回收目的基因片段以及表达载体片段, 二者加入 T4 DNA 连接酶过夜连接, 转化于化学感受态大肠埃希菌 MC1061 中, 获得的阳

性克隆载体 PNZ8148-Cp51 送北京六合华大基因科技有限公司测序。

1.2.2 电转化 按照 Holo 等^[13]的方法制备 NZ9000 感受态细胞, 加入质粒 PNZ8148-Cp51, 转移至 2 mm 电击杯中, 调节好电转仪 BTX Gemini X2 参数 (电压 1 800 V, 200 Ω , 25 μ F), 电击约 4.5 ms 后, 加入 1 mL 冰预冷的 GM17MC 恢复培养基, 30 $^{\circ}$ C 静置 2 h, 取上述液体分 10、100 和 900 μ L 进行涂板 (GM17C 固体培养基) 厌氧培养 2 d。挑取单菌落, 于 5 mL 的 GM17C 液体培养基中过夜培养。获得含有目的基因的阳性乳酸菌 *L. lactis* NZ9000/PNZ 8148-Cp51, 阳性克隆测序确认。同样方法转化空载体 PNZ8148 作阴性对照, 菌株为 NZ9000/PNZ 8148。

1.2.3 *L. lactis* NZ9000/PNZ 8148-Cp51 的蛋白表达

将重组表达菌以 1:100 的体积比接种于 GM17C 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C 条件下静置培养过夜; 将过夜培养物以 1:50 的体积比接种于 GM17C 液体培养基, 继续培养约 2.5 h 至细菌 $D_{600\text{nm}} \approx 0.5$; 分为诱导组和对照组 (不诱导), 诱导组加入 Nisin 至终质量浓度为 1 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 诱导 6 h 后终止培养, 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分别得到菌体沉淀和培养液上清。菌体沉淀重悬于 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑溶液中, 功率 400 W, 超声 4 s, 间隔 6 s, 超声次数 200 次, 破碎后分离上清与沉淀, 沉淀用 PBS 缓冲液重悬。破碎上清液与沉淀各取 50 μ L, 加入 10 μ L 6 $\times$ Protein loading buffer。培养液上清用脱氧胆酸盐三氯乙酸 (DOC-TCA) 沉淀法进行检测; 取 1 mL 培养液上清, 加入 10 μ L 2 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的脱氧胆酸钠溶液和 150 μ L 100 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的三氯乙酸溶液, 4 $^{\circ}$ C 条件下静置 30 min 后, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 加入 1 mL 预冷的丙酮洗涤沉淀 2 次, 将沉淀溶解于 50 μ L 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液中, 加入 10 μ L 的 6 $\times$ Protein loading buffer。各处理样品同时作空载对照。将上述处理好的破碎上清液、破碎沉淀、培养液上清样品进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.4 重组蛋白纯化 用“1.2.3”诱导组的培养方法处理 5 L 菌液, 用 GE 公司的纯化柱及镍填料纯化目的蛋白, 选择不同浓度的咪唑溶液 (20~200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 梯度洗脱, 纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 确定洗脱液的最佳咪唑溶液浓度。并用 BCA 法测定蛋白浓度。选择最佳浓度进行, 用透析袋进行浓缩, 以便后续进行效果测试。

1.2.5 重组蛋白的 Western Blot 检测 将“1.2.3”和“1.2.4”中的 SDS-PAGE 电泳后的蛋白胶, 切成 5 cm $\times$ 5 cm 大小, 超厚转印滤纸以及硝酸纤维素

膜先用膜转移缓冲液浸泡湿润, 在伯乐半干转印槽上依次从下而上放置超厚转印滤纸、硝酸纤维素膜、蛋白胶、超厚转印滤纸, 去除气泡后, 盖好接通电源, 15 V 电压下电泳 15 min。转印后, 小心夹出硝酸纤维素膜, 于装有质量浓度为 5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脱脂奶粉的培养皿上封闭 1 h, 按体积比 1:2 000 加入小鼠抗 His 抗体, 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 按体积比 1:5 000 加入羊抗小鼠 HRP-IgG 抗体, 室温摇床孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次, 将超敏 ECL 化学发光试剂的 A、B 发光液按照 1:1 的体积比混合, 发光显色, 拍照保存。

1.2.6 裂解酶杀菌效果测定 为验证乳酸菌表达产物的杀菌效果, 选取产气荚膜梭菌 Cp2-4 作为测试对象, 用比浊法, 按文献 [12] 的方法测定 Cp51 裂解酶的杀菌效果, 并设置阴性对照。

1.2.7 重组乳酸菌 NZ9000/PNZ8148-Cp51 体外抑菌试验 取出 27 支灭菌试管, 各加入 10 mL LB 液体培养基, 27 支试管分为 A、B、C 共 3 组, 每组 9 支, 依次编号 A1~A9、B1~B9、C1~C9。将预先制备好的重组乳酸菌 NZ9000/PNZ8148-Cp51 和空载乳酸菌 NZ9000/PNZ8148 的细菌数调节为 $1.4 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, A 组所有试管中加入 100 μ L 重组乳酸菌, B 组中加入 100 μ L 空载乳酸菌。取预先制备好的产气荚膜梭菌 Cp2-4, 加入生理盐水调节细菌数为 $1.4 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 迅速往所有试管中添加 100 μ L Cp2-4, A1、B1 和 C1 直接倍比稀释后涂板, 记为 0 h, 往后, 分别在 6、12、24、36、48、60、72 和 84 h 取 1 支试管, 10 倍倍比稀释, 稀释至 10^8 倍, 取 100 μ L 涂 TSC-卵黄平板, 每个稀释度作 3 个重复, 厌氧培养, 对产气荚膜梭菌进行细菌计数。

1.2.8 数据处理 利用 Microsoft Excel 2016 进行数据处理, 用 GraphPad Prism 7 进行绘图。

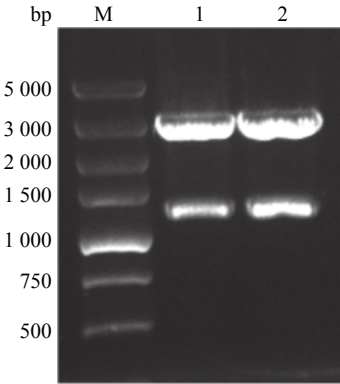
2 结果与分析

2.1 乳酸菌表达载体构建与鉴定

构建的质粒电转化乳酸菌后, 获得阳性克隆菌, 提取重组乳酸菌质粒, 质粒经内切酶 *Nco*I 和 *Hind*III 双酶切后, 得到 2 个条带 (图 1), 载体大小为 3 100 bp, 目的基因 Cp51 为 1 268 bp, 经测序, 确定序列正确。

2.2 蛋白表达结果

重组菌 NZ9000/PNZ8148-Cp51 经 Nisin 诱导后, 上清和沉淀分别与空载相比较, 均未见明显目的条带, 可能是乳酸菌表达量较低, 以致肉眼看不到目的条带, 有待纯化以及 Western Blot 的进一步验证。



M: DNA marker DL5000; 1: 大肠埃希菌中构建的阳性质粒; 2: 乳酸菌 NZ9000 中的重提质粒

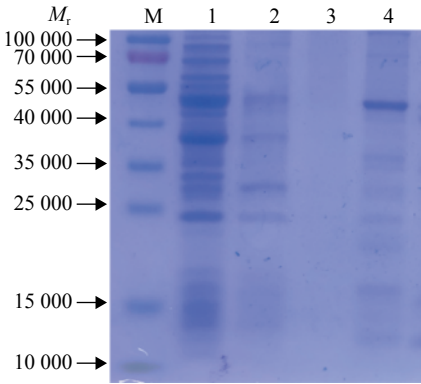
M: DNA marker DL5000; 1: Positive plasmid in *Escherichia coli*; 2: Positive plasmid extracted from *Lactococcus lactis* NZ9000

图 1 重组质粒 PNZ 8148-Cp51 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid PNZ 8148-Cp51 by enzyme digestion

2.3 重组蛋白纯化结果

重组菌经大量培养, 破碎后, 上清纯化, 经 5 次洗涤后, 用高浓度咪唑溶液洗脱, 试验结果表明, 150 mmol·L⁻¹ 的咪唑溶液能大量洗脱目的蛋白 (图 2), 经 BCA 试剂盒测定, 蛋白质质量浓度为 124 μg·mL⁻¹。



M: 蛋白 marker; 1: 蛋白流穿液; 2: 初次洗涤液; 3: 末次洗涤液; 4: 150 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱液

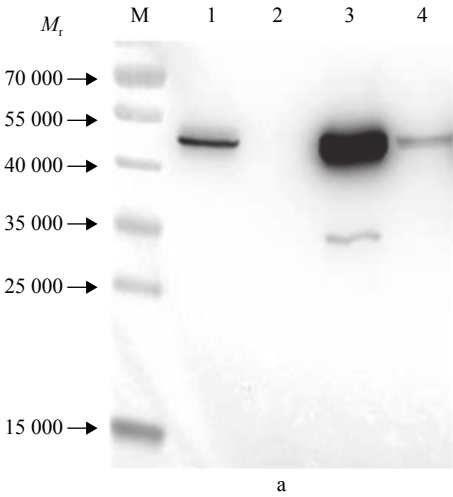
M: Protein marker; 1: Flow-through solution; 2: First washing solution; 3: Last washing solution; 4: 150 mmol·L⁻¹ imidazole elution

图 2 NZ9000/PNZ8148-Cp51 蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified NZ9000/PNZ8148-Cp51 protein

2.4 Western Blot 检测结果

Western Blot 检测结果显示, NZ9000/PNZ8148-Cp51 菌经诱导后, 培养液上清中有目的蛋白存在; 不诱导的菌体中也有微弱表达 (图 3a), NZ9000/PNZ8148-Cp51 菌诱导后, 破碎上清以及沉淀均有目的蛋白存在 (图 3b)。



M: 蛋白 marker; 1: NZ9000/PNZ8148-Cp51 诱导培养液上清; 2: NZ9000/PNZ8148(空载) 诱导菌; 3: NZ9000/PNZ8148-Cp51 诱导菌; 4: NZ9000/PNZ8148-Cp51 不诱导菌; 5: NZ9000/PNZ8148-Cp51 诱导条带; 6: NZ9000/PNZ8148-Cp51 诱导破碎上清; 7: NZ9000/PNZ8148-Cp51 诱导破碎沉淀

M: Protein marker; 1: NZ9000/PNZ8148-Cp51 induced supernatant; 2: NZ9000/PNZ8148(negative control) induced bacteria; 3: NZ9000/PNZ8148-Cp51 induced bacteria; 4: NZ9000/PNZ8148-Cp51 non-induced bacteria; 5: NZ9000/PNZ8148 supernatant; 6: NZ9000/PNZ8148-Cp51 induced supernatant; 7: NZ9000/PNZ8148-Cp51 induced precipitate

图 3 NZ9000/PNZ8148-cp51 Western Blot 检测结果

Fig. 3 Detection of NZ9000/PNZ8148-Cp51 by Western Blot

2.5 裂解酶裂菌效果

裂解酶对产气荚膜梭菌抗菌效果见图 4, 从图 4 中可以看出质量浓度为 1 μg·mL⁻¹ 以上的重组乳酸菌 NZ9000/PNZ8148-Cp51 表达的噬菌体裂解酶均对 A 型产气荚膜梭菌有高效抗菌活性。

2.6 重组乳酸菌 NZ9000/PNZ8148-Cp51 体外抑菌结果

产气荚膜梭菌与乳酸菌混合培养后, 比较活菌数对数值, 发现乳酸菌使产气荚膜梭菌活菌数从 9×10⁹ CFU·mL⁻¹ 下降到约 9×10⁸ CFU·mL⁻¹。培养

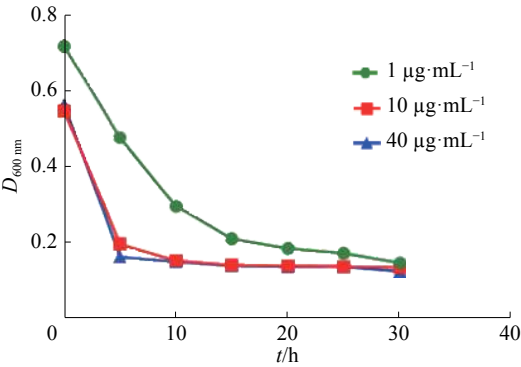


图 4 不同浓度 NZ9000/PNZ8148-Cp51 噬菌体裂解酶对 A 型产气荚膜梭菌的抗菌活性

Fig. 4 Antibacterial activities of different concentrations of NZ9000/PNZ8148-Cp51 phage lysin against *Clostridium perfringens* type A

早期重组乳酸菌相比空载乳酸菌发挥了更强的抑制效果,但随着时间推移,24 h 后重组乳酸菌与空载乳酸菌之间的差异不明显 (图 5)。

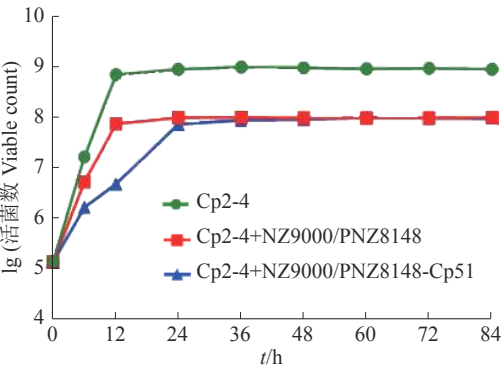


图 5 产气荚膜梭菌 Cp2-4 单独培养及混合培养生长曲线

Fig. 5 Growth curves of *Clostridium perfringens* Cp2-4 in pure and mixed cultures

3 讨论与结论

不同于抗生素的杀菌机制,噬菌体裂解酶具有高特异性、对人类和动物无毒副作用以及不会产生药物残留等优势,因此有广阔的应用前景^[14]。目前,多种细菌的噬菌体裂解酶可通过大肠埃希菌表达系统获取^[15-16],尽管大肠埃希菌表达系统成本低、产量高,但其以异丙基 β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 等有毒物质进行诱导,需经过复杂的分离纯化,且蛋白进入消化道即可被降解,存在时间短,在动物体内难以起到有效杀菌作用。与之相比,采用乳酸菌表达系统,可免除复杂繁琐的提纯步骤,且乳酸菌为非致病性微生物,若作为蛋白药物的投递载体,其益生效果可以得到加强。利用乳酸菌表达活性酶有广泛的应用, Liang 等^[17] 将纳豆激酶的基因转入乳球菌中成

功表达,产生的重组蛋白对纤维蛋白的溶解活性达到 41.7 U·mL⁻¹,可用于控制和预防血栓; Han 等^[18] 用乳酸菌表达超氧化物歧化酶,对炎症性肠道疾病有治疗作用。 Martin 等^[19] 构建的重组表达 IL-10 的乳球菌 MG1363,灌胃给小鼠后,能降低肠道通透性,促进免疫激活。重组的乳酸菌可以用来表达不同类型的蛋白,比如各种酶、抗原、细胞因子^[20-21],用乳酸菌重组表达裂解酶,对于防治细菌疾病的前景广阔。

相比大肠埃希菌表达,乳酸菌表达有诸多优势,在本研究中,利用乳酸菌与噬菌体裂解酶的双重抑菌和杀菌优势,通过构建重组乳酸菌 NZ9000/PNZ8148-Cp51 表达噬菌体裂解酶并对产气荚膜梭菌进行杀灭效果试验,蛋白电泳结果显示表达量较低, Western Blot 检测结果则表明,诱导后重组菌培养液中能检测到可溶性目的蛋白,且在不添加诱导剂条件下,也检测到菌体的微量表达产物。体外杀菌效果测定结果显示,构建的重组乳酸菌表达的裂解酶产物有强杀菌活性;体外菌液共培养试验表明,重组菌对 A 型产气荚膜梭菌有一定的抑菌效果,乳酸菌和噬菌体裂解酶能起到加成的抑菌作用。国内外研究表明,噬菌体裂解酶具有极大的医用潜力,开发噬菌体裂解酶产品对革兰阳性病原菌有广阔的应用前景^[22]。本研究成功构建 A 型产气荚膜梭菌噬菌体裂解酶重组乳酸菌,为将来新型抗菌药的实际应用奠定了基础。

参考文献:

[1] PETIT L, GIBERT M, POPOFF M R. *Clostridium perfringens*: Toxinotype and genotype[J]. *Trends Microbiol*, 1999, 7(3): 104-110.

[2] ROOD J I, ADAMS V, LACEY J, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme[J]. *Anaerobe*, 2018, 53: 5-10.

[3] ZAHOOR I, GHAYAS A, BASHEER A. Genetics and genomics of susceptibility and immune response to necrotic enteritis in chicken: A review[J]. *Mol Biol Rep*, 2018, 45(1): 31-37.

[4] PARISH W E. Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*): I: Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*[J]. *J Comp Pathol*, 1961, 71: 377-393.

[5] SCHUCH R, PELZEK A J, RAZ A, et al. Use of a bacteriophage lysin to identify a novel target for antimicrobial development[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60754.

[6] POWWELS P H, LEER R J, SHAW M, et al. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes[J]. *Int J Food Microbiol*, 1998, 41(2): 155-167.

[7] 刘斌, 黄少磊, 刘彦民, 等. 分子标记技术应用于乳酸菌分类鉴定的研究进展 [J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(7): 670-673.

[8] 郝凤奇, 王春风, 杨桂连, 等. 牛乳中乳酸乳球菌 *nis-RK* 基因的克隆与序列分析 [J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(1): 108-112.

[9] 丁瑞雪, 王一然, 乌日娜, 等. 发酵乳调控人体肠道营养健康的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 281-287.

[10] 杨芳, 郭瑞凤. 益生菌联合肠内营养在重症患者疾病治疗中的应用 [J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(12): 2702-2706.

[11] 唐丽杰, 徐毅刚, 葛俊伟, 等. 乳酸乳球菌 NZ9000 在小鼠体内的定植研究 [J]. 中国乳品工业, 2007(7): 11-12.

[12] 吕梦娜, 龙航宇, 王丽梅, 等. A 型产气荚膜梭菌噬菌体裂解酶 Cp51 的原核表达及活性检测 [J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(5): 19-23.

[13] HOLO H, NES I F. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media[J]. Appl Environ Microbiol, 1989, 55(12): 3119-3123.

[14] BORYSOWSKI J, WEBER-DABROWSKA B, GORSKI A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2006, 231(4): 366-377.

[15] 葛怀娜, 刘珊珊, 刘金福, 等. 李斯特菌噬菌体裂解酶 CBD 蛋白的克隆与表达 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(16): 234-237.

[16] 苑文涛, 张亚宁, 夏雨婷, 等. 猪丹毒杆菌噬菌体裂解酶的原核表达及活性检测 [J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(10): 37-40.

[17] LIANG X, ZHANG L, ZHONG J, et al. Secretory expression of a heterologous nattokinase in *Lactococcus lactis*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75(1): 95-101.

[18] HAN W, MERCENIER A, AIT-BELGNAOUI A, et al. Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase[J]. Inflamm Bowel Dis, 2006, 12(11): 1044-1052.

[19] MARTIN R, CHAIN F, MIQUEL S, et al. Effects in the use of a genetically engineered strain of *Lactococcus lactis* delivering in situ IL-10 as a therapy to treat low-grade colon inflammation[J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10(6): 1611-1621.

[20] YANG Y, KANG Z, ZHOU J, et al. High-level expression and characterization of recombinant acid urease for enzymatic degradation of urea in rice wine[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(1): 301-308.

[21] MOBERGSLIEN A, VASOVIC V, MATHIESEN G, et al. Recombinant *Lactobacillus plantarum* induces immune responses to cancer testis antigen NY-ESO-1 and maturation of dendritic cells[J]. Hum Vaccin Immunother, 2015, 11(11): 2664-2673.

[22] 杨航, 余军平, 危宏平. 裂解酶治疗的研究进展与应用前景 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 178-184.

【责任编辑 庄 延】